

**ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ КАЛЬЦИЙ-РАЗРЯЖЕННОГО ОБЕЛИНА:
СТРУКТУРА И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ
ФОРМИРОВАНИЯ ЭМИТТЕРА**

© 2008 г. Ф. Н. Томилин, Л. Ю. Антипина, Е. С. Высоцкий,
С. Г. Овчинников, академик И. И. Гительзон

Поступило 04.05.2008 г.

Особое место среди многообразия биологически-люминесцентных систем занимают системы, названные “предварительно заряженными”. Наиболее известными и изученными представителями этого типа биологически-люминесцентных систем являются Ca^{2+} -регулируемые фотопротейны, ответственные главным образом за свечение морских кишечнополостных животных [1]. Молекула фотопротейна представляет собой стабильный фермент-субстратный комплекс, состоящий из односубъединичного полипептида и “преактивированного” кислородом субстрата – 2-гидропероксицелентеразина, прочно, но нековалентно связанного с белком. Биологически-люминесценция инициируется ионами кальция и возникает вследствие окислительного декарбоксилирования связанного с белком субстрата. В результате образуются продукт реакции, целентерамид, в возбужденном состоянии и CO_2 . Переход целентерамида из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением света. Биологически-люминесценция фотопротейнов не зависит от O_2 , так как кислород уже связан в форме 2-гидропероксипроизводного целентеразина с белком. Отсутствие зависимости от кислорода является одним из основных отличий реакции фотопротейнов от других биологически-люминесцентных реакций, катализируемых люциферазами. Биологически-люминесценция фотопротейнов наблюдается в диапазоне 465–495 нм и зависит от организма, из которого фотопротейн выделен. Фотопротейны, связанные с 2-гидропероксицелентеразином, не флуоресцируют, но проявляют яркую флуоресценцию после реакции, когда связаны с целентерамидом (CLM).

С момента открытия Ca^{2+} -регулируемые фотопротейны интенсивно исследуются. Определены структуры субстрата и продукта реакции, предложен химический механизм биологически-люминесцентной реакции. Недавно определены пространственные структуры нескольких лигандзависимых конформационных состояний фотопротейнов [2]. Молекула фотопротейна представляет собой компактную глобулярную структуру, в центре которой в изолированной от растворителя полости расположена молекула 2-гидропероксицелентеразина. Окисление субстрата, так же как и связывание с молекулой белка ионов кальция, существенно не изменяет структуру фотопротейна. Именно защищенность субстрата и продукта реакции от растворителя, по-видимому, и обеспечивает необходимое окружение для эффективного образования продукта в возбужденном состоянии с последующей его эффективной реализацией в виде кванта света.

Однако пространственная структура белка обеспечивает информацию только о статическом состоянии белковой молекулы и аминокислот активного центра. Какие изменения происходят непосредственно в ходе реакции, остается неизвестным. Восполнить этот пробел позволяют современные квантово-химические методы расчетов, которые в настоящее время широко применяются для решения задач подобного уровня.

В данной работе с помощью квантово-химических методов исследован молекулярный механизм флуоресценции Ca^{2+} -разряженного фотопротейна обелина из гидроидов *Obelia longissima*.

МОДЕЛЬ И МЕТОДЫ

В работах [3, 4] исследована флуоресценция целентерамида и его аналогов в растворителях с различной полярностью. Авторы установили, что в зависимости от растворителя возбужденный CLM может образовывать пять различных ионных форм (рис. 1).

*Институт физики им. Л.В. Киренского
Сибирского отделения Российской Академии наук,
Красноярск
Институт биофизики
Сибирского отделения Российской Академии наук,
Красноярск
Сибирский федеральный университет, Красноярск*

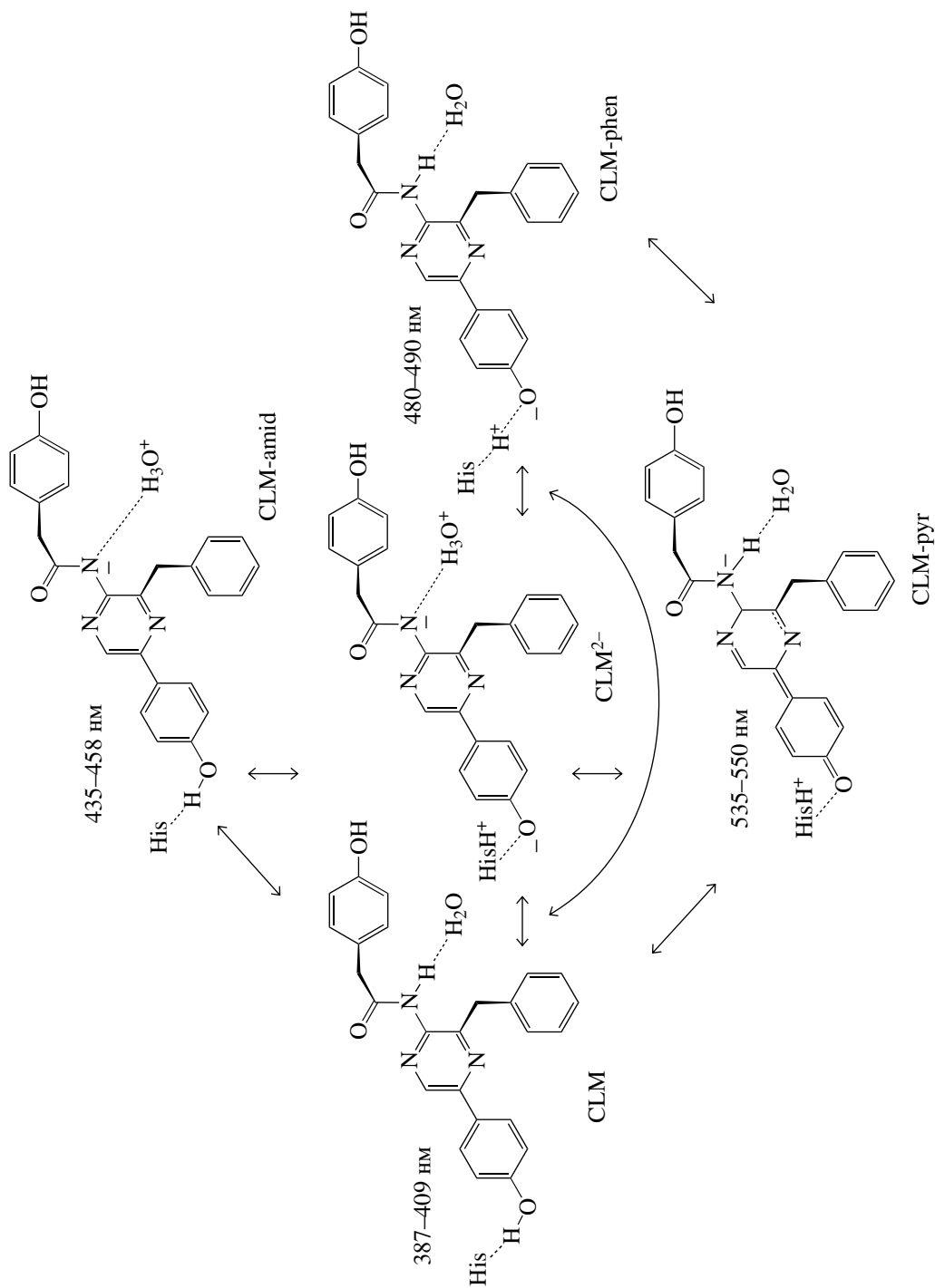


Рис. 1. Возможные формы центральной молекулы целестрамида.

Теоретическое моделирование проводили для всех ионных форм CLM (рис. 1), используя квантово-химический полуэмпирический метод PM3 [5], так как из-за большого количества атомов в системе применение первопринципных *ab initio* методов занимает значительное количество времени и компьютерных ресурсов. В то же время полуэмпирический метод Хартри–Фока PM3 позволяет рассчитывать большое количество атомов за достаточно короткое время и учитывает электростатическое взаимодействие, что крайне необходимо в случае моделирования систем с участием белков. Так как для моделирования спектров поглощения и люминесценции необходимо учитывать еще и межэлектронное кулоновское взаимодействие, расчеты проводили с использованием метода конфигурационного взаимодействия (КВ). Метод КВ характеризуется набором занятых и вакантных молекулярных орбиталей, на которых происходят однократные возбуждения электронов. В расчетах использовали 10 занятых и 6 вакантных орбиталей (121 конфигурация).

В квантово-химических расчетах для моделирования спектров поглощения, как правило, используют метод КВ с возбуждениями электронов относительно основного состояния. Для моделирования процессов релаксации электрона по возбужденным уровням необходима оптимизация возбужденного уровня методом КВ. В результате определяется разница в энергии между первым возбужденным уровнем и основным. Данная разница показывает энергию перехода электрона и, как следствие, длину волны излучения.

КЛАСТЕРНАЯ МОДЕЛЬ РАСЧЕТОВ

Данные расчета длины волны излучения целентерамида в вакууме без какого-либо окружения значительно расходятся с экспериментальными значениями, полученными для флуоресценции обелина. Поэтому в кластерную модель было включено ближайшее аминокислотное окружение полости, в которой находится целентерамид, в предположении, что оно может сильно влиять на формирование возбужденного состояния CLM. Между CLM и окружением нет химического взаимодействия, влияние аминокислотного окружения проявляется электростатически. Поэтому при расчете эмиттера надо учитывать ближайшее окружение, которое в свою очередь влияет на его состояние. Для моделирования системы необходимо, чтобы аминокислотное окружение было зафиксированным и играло роль только электростатического поля, которое оказывало влияние на эмиттер. Рассчитывалась молекула целентерамида (около 50 атомов) и ее ближайшее аминокислотное окружение на расстоянии порядка 4 Å от атомов CLM: His22, Gly143, Tyr190, Met171, Trp114, Phe72, Trp179, Phe28, Ala46, Phe88,

Val118, Trp92, Ile50, Met25, Leu29, Gly115, Thr172, His175, Ile144, Asp49, Ser142, Lis53, Lis45, Cys51, Leu54, His64, Phe122, 5H₂O, всего около 500 атомов (рис. 2).

Для того чтобы смоделировать в расчетах процесс флуоресценции, следует проверить все возможные формы CLM, которые могут являться кандидатами на роль эмиттера. Исходя из этого, были рассчитаны спектры поглощения и флуоресценции для всех ионных форм (рис. 1).

Так как напротив амидного протона находится молекула H₂O, то существует некоторая вероятность, что азот может отдать протон на молекулу воды с образованием CLM-амида и иона гидроксония. Также возможен переход протона от фенольного кислорода на азот His22. Если эти два процесса происходят одновременно, то образуется молекула дианиона (CLM²⁻). Однако процесс передачи протона с амидного азота на молекулу воды маловероятен, так как связь N–H достаточно сильная, а образующийся ион гидроксония как сильная кислота мгновенно отдаст протон обратно на азот.

Депротонирование фенолята, особенно в возбужденном состоянии – процесс достаточно распространенный. Поэтому образование фенолята по сравнению с образованием амид-аниона и дианиона видится более вероятным. Пиразин может образоваться, когда водород долгое время находится на His22 и происходит перестройка химических связей в феноляте CLM (рис. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ

Геометрия молекулы целентерамида. При оптимизации структур происходят изменения длин связи у всех ионных форм целентерамида (рис. 1), но они не превышают 0.1 Å. Наиболее сильные изменения происходят около атомов, которые могут отдавать протон, и на атомах гетероцикла. Можно сделать вывод, что атомы гетероцикла достаточно сильно подвергаются влиянию аминокислотного окружения и в большей степени участвуют в перераспределении заряда.

Спектр люминесценции. Энергия излучения ионных форм была рассчитана методом КВ (табл. 1). Энергия перехода считалась по формуле

$$E_{\text{пер}} = E_{\text{возб}} - E_{\text{осн}},$$

длина волны

$$\lambda = \frac{hc}{E_{\text{пер}}},$$

где h – постоянная Планка, c – скорость света в вакууме.

Из данных таблицы видно, что длины волн CLM⁰ и CLM-амид близки к экспериментальным значениям, полученным для этих форм в различ-

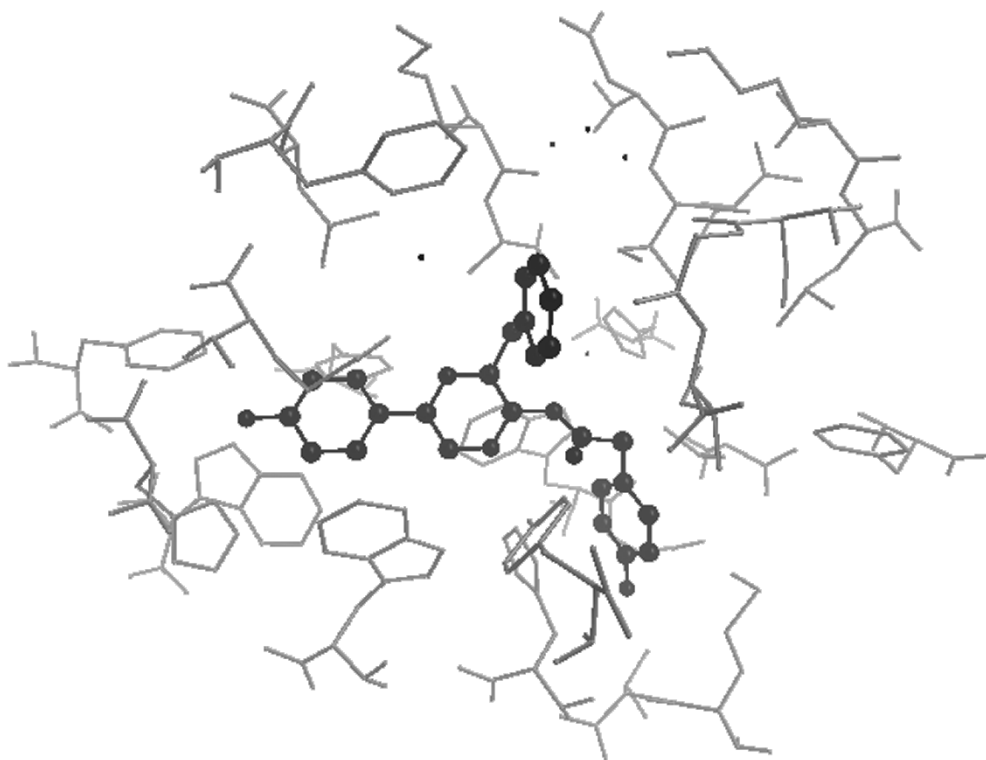


Рис. 2. Обелин, модельный кластер для расчетов.

ных растворителях, но не подходят под экспериментальное значение флуоресценции обелина (максимум 495–510 нм). Значит, они не подходят на роль эмиттера, так как их энергии излучения гораздо больше, чем энергия максимума флуоресценции (2.40–2.50 эВ). Расчет пиразин-аниона показывает длину волны излучения в районе 520 нм, что в принципе хорошо подходит под флуоресценцию пиразина в растворителях, но плохо подпадает под флуоресценцию белка обелина. Если бы во флуоресцентном состоянии в обелине образовывался пиразин, то наблюдался бы четкий пик в районе 520–550 нм, соответствующий нахождению пиразиновой формы в системе, либо пик был бы би-

модальным для фенольной и пиразиновой форм. Все это приводит к тому, что пиразин не годится на роль эмиттера флуоресценции обелина.

В результате отрыва протона образуется анион с отрицательным зарядом на фенольном кислороде. Кислород способен моментально образовывать двойную связь с бензольным кольцом. Это приводит к перестройке структуры с образованием пиразин-аниона.

В связи с этим мы проводили моделирование положения атома водорода между фенольной группой CLM и His22. Для этого расстояние между крайними положениями нахождения водорода 2.42 Å (рис. 3) делилось на 30 равных частей и в каждом положении рассчитывалась длина волны излучения (табл. 2).

Положение атома водорода сильно влияет на длину волны излучения. По сути, данная модель отображает процесс образования комплекса с переносом протона, который получил название “Ion-pair proton transfer” [3, 4] или комплекс с переносом протона.

Из табл. 2 видно, что состояние наиболее устойчиво при положении протона на расстоянии 0.92 Å, т.е. при перемещении протона на расстояние от 0.9 до 1.5 Å и дальше требуется около 3.3–3.6 эВ. Эти значения энергий хорошо согласуются со спектром возбуждения Ca^{2+} -разряженного

Таблица 1. Рассчитанные и экспериментальные длины волн флуоресценции различных ионных форм целентерамида

Ионная форма целентерамида	Расчет $E_{\text{пер}}$, эВ	Расчет λ , нм	Эксперимент* λ , нм
CLM ⁰	3.93	375	387–409
CLM ²⁻	3.25	382	–
CLM-amid	2.88	430	435–458
CLM-пуг	2.39	520	535–550

* Из работы [3].

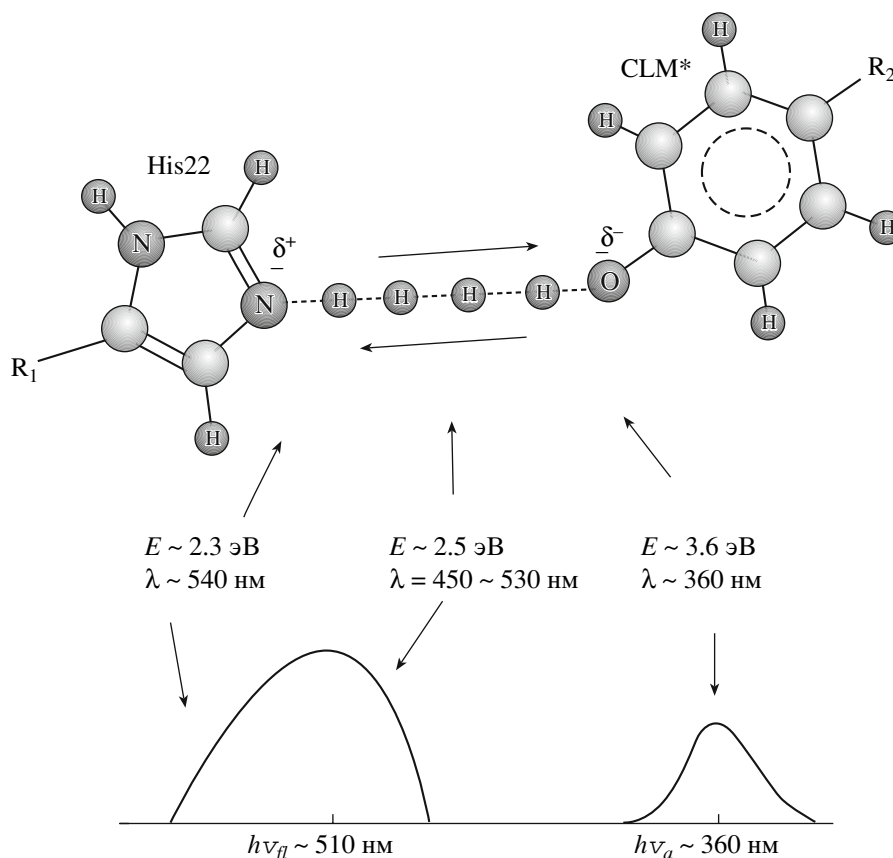


Рис. 3. Моделирование процесса переноса водорода между центральной молекулой и His22. В нижней части рисунка схематично показаны спектры флуоресценции ($h\nu_{fl}$) и поглощения ($h\nu_a$).

обелина (рис. 3). Нахождение протона на расстоянии большем, чем 1.7 Å, энергетически невыгодно и соответственно вероятность излучить из этих состояний очень мала (табл. 2). Возвращение $H^{\delta+}$ к $O^{\delta-}$ целентерамида сопровождается высвобождением энергии порядка 2.4–2.5 эВ (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитанные энергии излучения амид-аниона, дианиона и нейтральной формы целентерамида не совпадают с флуоресценцией обелина, поэтому данные эмиттеры CLM можно исключить. При образовании пиразин-аниона в растворителях в спектре флуоресценции возникает устойчивый максимум в области 535–550 нм. Экспериментальный спектр флуоресценции обелина имеет только один максимум в районе 490 нм. Поэтому можно сделать вывод, что пиразин-анион не образуется.

На данный момент не существует четкого экспериментального доказательства, что является эмиттером реакции. Пиразин-анион не подходит под спектр флуоресценции, а фенолят-анион нельзя рассчитать, потому что при оптимизации геометрии он структурно переходит в форму пи-

разина. В связи с этим была построена модель, в которой энергетическая разница между возбужденным и основным уровнями зависит от положения протона между кислородом целентерамида и азотом аминокислотного окружения (рис. 3).

Моделирование переноса протона в системе His22...CLM показало, что для удаления протона от фенольной группы CLM на расстояние до 1.5 Å необходимо затратить энергию порядка 3.6 эВ, что соответствует энергии возбуждения для процесса флуоресценции (рис. 3).

При возвращении протона в исходное состояние излучается энергия в интервале 2.3–2.5 эВ. Поскольку процесс излучения при переходе из возбужденного состояния в основное спонтанный, протон может возвращаться к целентерамиду с разных расстояний и это соответственно приводит к уширению пика флуоресценции.

Таким образом, процесс флуоресценции Ca^{2+} -разряженного обелина (возможно, и других Ca^{2+} -разряженных фотопротеинов) хорошо моделируется перемещением протона от кислорода фенольной группы CLM до азота аминокислоты His22. Вероятнее всего, аналогичный процесс имеет место и при биолюминесцентной реакции фотопротеи-

Таблица 2. Длина волны флуоресценции в зависимости от положения протона

Расстояние CLM–H, Å	Энергия основного состояния, эВ	$E_{\text{пер}}$, эВ	λ , нм
0.92	-4644.18	3.62	343
1.31	-4642.23	3.62	343
1.36	-4641.91	3.62	343
1.40	-4641.67	3.65	340
1.47	-4641.18	3.42	363
1.50	-4640.96	3.27	380
1.56	-4640.50	2.97	417
1.60	-4640.18	2.79	445
1.63	-4639.91	2.65	469
1.64	-4639.80	2.53	492
1.78	-4638.57	1.63	763
1.85	-4637.91	1.96	633
1.90	-4637.31	2.00	620
1.96	-4636.49	2.02	615
2.02	-4635.34	2.04	610

нов. Следовательно, можно сделать вполне обоснованное предположение, что и спектр биолюминесценции также определяется положением протона между атомом кислорода фенольной группы CLM в возбужденном состоянии и атомом азота His22.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 07-04-00930-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Высоцкий Е.С., Маркова С.В., Франк Л.А.* // Молекуляр. биология. 2006. Т. 40. № 3. С. 404–417.
2. *Vysotski E.S., Lee J.* // Accounts Chem. Res. 2004. V. 37. P. 405–415.
3. *Shimomura O., Teranishi K.* // Luminescence. 2000. V. 15. P. 51–58.
4. *Mori K., Maki S., Niwa H. et al.* // Tetrahedron. 2006. V. 62. P. 6272–6288.
5. *Stewart J.J.* // J. Comput. Chem. 1989. V. 10. P. 209–220.